

III. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНЕТИКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА РЕГЕНЕРАЦИИ КАК ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРИЗНАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

Т. С. Фадеева, Л. А. Лутова, О. Г. Козырева

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Проблема реализации генотипа и генетического контроля дифференцировки тканей и органов в онтогенезе представляет собой одну из важнейших проблем биологии, и в частности генетики. Процесс дифференцировки изучается с использованием разных методов, при этом весьма важно применение физиологических и биохимических методов. Роль морфологических методов до сих пор в биологии исключительно велика, тем более, что они постоянно совершенствуются и в некоторых отношениях ушли вперед по сравнению с биохимическими и другими методами. Но морфологические методы, в основном, лишь констатируют явление, не вскрывают его причинность, сущность. При изучении причинности и соподчиненности процессов дифференцировки представляет значительный интерес использование генетического метода и соответственно генетических моделей, пригодных для решения тех или иных вопросов. В качестве таких моделей могут быть использованы мутанты с аномальным ходом морфогенеза и их гибриды с разной степенью восполнения недостаточностей, представленных у мутантов. Такие мутанты могут являться своего рода маркерами отдельных этапов морфогенеза растения.

Примером этому может быть изучение генетики и фенотипики мутантов с измененным типом роста, их гибридов и форм с нормальным, «диким», типом роста. Анализ морфологических признаков — структуры — осуществляется значительно легче, чем биохимический и физиологический, но вместе с этим изменение в структуре тесно связано с изменением физиологических и биохимических особенностей, и, таким образом, изучение морфологии в ряде случаев дает возможность подойти к изучению причинности процесса дифференцировки и изучению характера генетической детерминированности онтогенеза. Этот путь исследования может быть использован в случае наличия генетической коллекции — выделения соответствующих мутантов. Так изучаются мутанты карликового типа роста у кукурузы, томатов, риса (Pelton, 1964; Murakami, 1968, и др.), мутации отсутствия усов у земляники (Фадеева, 1966). В этом случае наряду с гибридологическими методом анализа и методом фенотипов используются физиологические и биохимические методы, а также создаются провокационные фоны — условия, способствующие выявлению мутантов.

При изучении детерминированности процессов роста у растений представляет интерес изучение мутантов с измененными потенциями ростовых процессов, например, с измененной по сравнению с диким типом способностью к регенерации. В пределах вида, сорта, очевидно,

можно выделить формы с разной регенерационной способностью — мутанты по признаку восстановительной регенерации. Изучение генетики и феногенетики этих мутантов с разной восстановительной способностью или с аномалиями в восстановительных процессах может быть моделью для изучения генетики процессов роста и дифференцировки.

Есть основание предполагать, что мутанты растений с разным типом роста — разной структурой — будут обладать и разными регенерационными способностями, так как некоторые из них отличаются от «дикого» типа по скорости клеточных делений, особенностям функционирования первичной корневой и стеблевой меристемы. Поэтому можно предположить, что дифференцировка тканей и функционирование раневых меристем также будут различны у мутантов и форм «дикого» типа. Для создания условий, в которых возможно сопоставить характер регенерационных потенций разных форм, возможно использовать асептическую культуру изолированных органов и тканей. В процессе этой работы стоит задача выделения форм с разным характером регенерационных процессов, мутантов с разным типом каллусообразования, корнеобразования и т. д. Эти мутанты с разной регенерационной способностью и могут быть использованы для изучения детерминации процессов роста и дифференцировки и при решении других специальных вопросов генетики.

Высказанные предположения базируются на данных экспериментальной ботаники, интенсивно изучавшей в конце прошлого и первой половине XX столетия процессы регенерации у представителей разных семейств цветковых растений (Vöchting, 1892, 1906; Simon, 1920; Küster, 1925; Кренке, 1950, и др.), и результатах работ, в которых, начиная с 50-х годов, изучаются процессы калусообразования и морфогенеза (Steward, 1961). Исследования, где бы проводилось выявление мутантов с разным характером регенерационных потенций, нам неизвестны.

Понятие «регенерационные потенции» мы используем широко, включая в понятие «регенерация» все восстановительные процессы, протекающие после повреждения (ранения) органов и тканей, т. е. собственно регенерацию и соматический эмбриогенез (Токин, 1959). Вслед за повреждением в тотипотентных клетках растений проходят локальные процессы дедифференциации — восстановление меристемной активности, тесно связанное с особенностями интактного растения (Фадеева, 1958). Дедифференцировка — это начальный и обязательный этап восстановительных процессов, за которым следуют собственно регенерационные процессы разного направления, зависящие от происхождения органа или ткани и условий, в которых протекает регенерация. Многообразие процессов и большая зависимость их от окружающих условий, чем процессов нормального морфогенеза, делают очень трудной задачу сравнительного изучения типов регенерации у разных форм одного и того же вида растений и тем более выделение форм (мутантов) по этому признаку.

Поэтому выполнению работы по созданию генетической коллекции мутантов с разным типом регенерации должна предшествовать тщательная методическая работа по созданию условий, в которых можно проводить оценку форм, а также отработка приемов подготовки эксплантата — выбор фазы развития растения, органа, ткани и их размеров. Большое внимание должно быть уделено разработке методов объективных учетов и характеристике процессов, протекающих в эксплантате и регенерате.

Основной задачей данного исследования была разработка методики анализа характера регенерационных процессов у разных форм

одного вида, а на основании этого изучение характера регенерационных процессов как генетического признака, т. е. обнаружение аллеломорфных состояний по данному признаку.

В качестве объектов для сравнительного изучения процессов регенерации взяты виды с разными регенерационными потенциями — редис (*Raphanus sativus* var. *radicola* Pers.) и горох (*Pisum sativum* L.). Горох обладает невысокими потенциями регенерации, т. е. плохо укореняется и, по существу, не срастается при самопрививках. У редиса эти потенции значительно выше: легко проходит срастание при самопрививках и прививках форм одного вида, возможно укоренение стеблевых и даже листовых черенков.

В данном сообщении изложены результаты работы с редисом. В нашей лаборатории генетики и цитогенетики растений старшим научным сотрудником С. И. Нарбут создана генетическая коллекция инбредных линий редиса, выделенных из трех сортов-популяций, хорошо различающихся морфологически и по некоторым физиологическим и биологическим свойствам и т. д. (Нарбут, 1966). Поскольку линии получены при инбридинге сортов-популяций редиса аллогамного растения, можно предполагать, что им присуща несбалансированность генетической системы. Несбалансированность выражается в дезинтеграции системы онтогенетических корреляций и взаимосоподчиненности процессов онтогенеза. У аллогамных растений (рожь, кукуруза, редис) это обнаружено в нарушении воспроизводительной системы (Müntzing, Akdik, 1948; Rees, 1955; Riley, Law, 1965; Полякова, Нарбут, Кожина, 1967, и др.). Возможно, что несбалансированность генетической системы распространяется и на вегетативные фазы. В генетической коллекции имеются линии редиса с аномалиями морфогенеза: «папа» — карликовая форма, линия «опухолевая» — на определенной фазе образующая опухоль на стеблевой и корневой частях растений (Нарбут, 1966). Возможно, что у линии «опухолевая» на определенной фазе роста реализуется мутация неорганизованного роста — образования локальных зон интенсивных клеточных делений с последующей дифференцировкой раневого типа в очагах делений.

В данном сообщении пойдет речь о разработке методов сравнительного изучения регенерационной способности у редиса. Задача работы состояла в выборе возраста растения, органа и ткани, от которого брали эксплантаты, в выяснении лучшего способа подготовки эксплантата к опыту и культивированию его, в отработке методов объективных учетов, при которых возможно оценивать результаты количественно.

Материал и методы. В качестве исходного материала в первых опытах использовали растения разного возраста: 10—20-дневные проростки, растения в фазе розетки, корнеплод, стебель и лист семенного растения. В основных опытах вели анализ по ранним фазам роста и развития — в этом случае легче осуществить стерилизацию и вести асептическую культуру. Кроме того, мутации, меняющие тип роста, реализуются на ранних фазах, поэтому именно на первых этапах роста можно ожидать различия.

Методику культивирования отработывали на сортовом материале — сортах Сакса и Вировский белый, а в дальнейшем приступили к сравнительному изучению инбредных линий. Сорта Сакса и Вировский белый — гетерозиготные популяции, поддерживающиеся при свободном внутрисортовом переопылении. Они различаются между собой по морфологическим признакам и биологическим свойствам.

Семена репродукции 1968 г. получены из Всесоюзного института растениеводства в 1970 г., семена репродукции 1966, 1967 гг. получены от С. И. Нарбут. Получение проростков без развития микрофлоры

оказалось возможным лишь при подборе стерилизатора и одновременно среды, на которой хорошо прорастают семена, но не развиваются колонии грибов и бактерий.

Были оценены следующие способы стерилизации семян: 1. Погружение в спирт с последующим обжиганием в пламени спиртовки; 2. Погружение в раствор хлорной извести (50 г/л) на 30 мин с последующей промывкой в дистиллированной воде; 3. Погружение на 5—8 мин в 15%-ную перекись водорода, и другие способы.

Для семян редиса лучшим способом стерилизации оказалось погружение в перекись водорода: семена на питательной среде прорастали до 100%, колонии грибов и бактерий встречались редко. Семена проращивались в асептических условиях в чашках Петри по 5—10 семян на агаризованной среде Уайта, при оптимальной температуре 24—26°. Проращивание проводилось на свету. В этих условиях семена прорастали на 3—4 день. Семядоли разворачивались на 4—5 день и достигали максимального размера на 8—10 день.

Регенераты получали от проростков 10-дневного возраста. От проростков отбирали две семядоли и два участка подсемядольного колена (рис. 1). В каждую чашку помещали по 4 регенерата от одного растения. Чашки находились в термостатированном помещении при 24—26°С в одних опытах и 22—24°С в других.

Снятие результатов опыта проводили через 10—15 дней после эксплантации, т. е. на 20—25 день после прорастания. Учет вели в основном визуальном, с оценкой морфологии каждого эксплантата в отдельности по балльной системе и подсчитывали число новообразований (корней). В первых опытах учитывали большое число признаков и показателей, но после поисковых опытов выделили лишь оптимально необходимое число учетов для характеристики регенератов.

В основу трехбалльной шкалы положены качественные различия между эксплантатами, что исключало ошибки в оценке результатов.

Результаты. Семядоли, отделенные от проростка и лишенные черешка, в процессе культивирования на среде восстанавливают черешок, на раневой поверхности образуется каллус (рис. 2), а в некоторых случаях и корни. Характер новообразований зависит и от температуры, и от среды выращивания, поэтому в опытах строго выравнивались условия культивирования. Развитие эксплантатов семядолей изучаемых сортов было несколько различным. Эксплантаты семядолей через 2—5 дней увеличились в размерах, причем в разной степени у сортов Сакса и Вировский белый (табл. 1). Результаты каждой из повторностей опыта не различались между собой. У Вировского белого увеличение размера эксплантата в баллах в разных повторностях опыта колеблется от 1,2 до 1,8, тогда как у Сакса от 1,6 до 2,4.

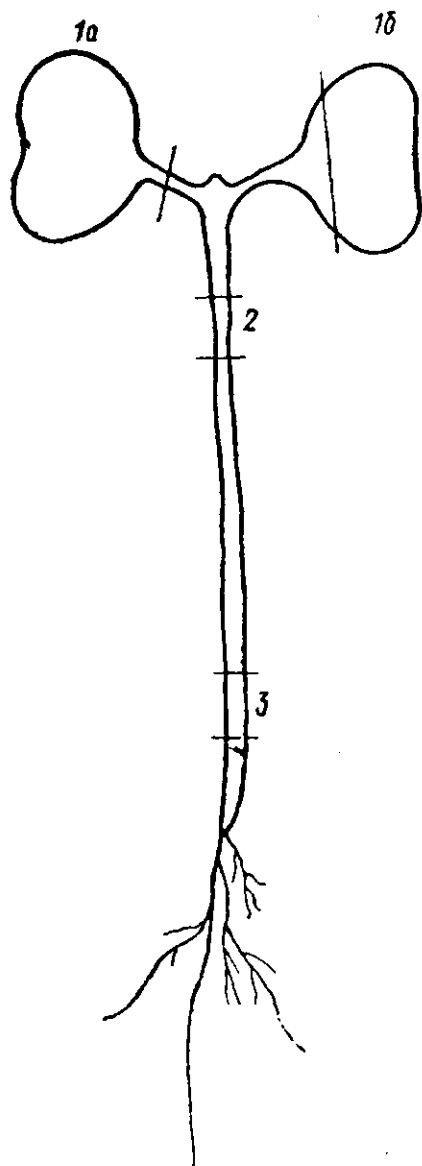


Рис. 1. Получение эксплантатов от проростков редиса.

1а — эксплантат семядоли с черешком;
1б — эксплантат семядоли без черешка;
2 — эксплантат верхней части гипокотыля;
3 — эксплантат гипокотыля.



Рис. 2. Образование на листовой пластинке семядолей каллуса и корешков.

a — каллус на листовой пластинке сорта Вировский белый, размер каллуса: балл 2.
б — каллус на листовой пластинке сорта Сакса, размер каллуса: балл 3.

Поэтому, при сопоставлении вели сравнение всей совокупности суммарно.

На раневой поверхности эксплантата формировалась каллусная ткань, большинство эксплантатов дали каллус: 72% у сорта Сакса и 69% у сорта Вировский белый. Размеры каллусов у двух сортов в среднем близки. В опыте 1969 г. различия по размеру каллуса не достоверны.

Для изолированных семядолей характерно восстановление — новообразование черешка. По этой способности сорта почти не различались между собой (табл. 1). Отсутствие у части эксплантатов новообразованных черешков связано, очевидно, с проведением операции — спосо-

Таблица 1

Характеристика эксплантатов проростков редиса сортов Сакса и Вировский белый (в баллах, 1969—1970 г.)

Показатели	Сакса		Вировский белый		t_{diff}
	n	$\bar{x} \pm m$	n	$\bar{x} \pm m$	
Размер семядолей *	139	$2,0 \pm 0,06$	132	$1,5 \pm 0,06$	6,4
Длина черешка семядоли	120	$1,4 \pm 0,07$	119	$1,7 \pm 0,08$	2,1
Толщина черешка семядоли	120	$1,5 \pm 0,20$	119	$1,5 \pm 0,22$	0,3
Длина верхней части гипокотили	70	$1,7 \pm 0,17$	70	$1,7 \pm 0,14$	0,1
Толщина верхней части гипокотили	70	$1,5 \pm 0,18$	70	$1,4 \pm 0,16$	0,6
Длина нижней части гипокотили	69	$1,6 \pm 0,21$	71	$1,4 \pm 0,19$	0,4
Толщина нижней части гипокотили	69	$1,4 \pm 0,17$	71	$1,2 \pm 0,16$	0,9

* Учет через 15 дней с начала культивирования.

бом отделения семядоли от зародыша, при которой была удалена меристемная зона у основания семядоли.

По типу каллуса выявлены качественные различия между сортами Сакса и Вировский белый: у большинства эксплантатов сорта Сакса каллус окрашен антоцианом, этого не наблюдалось у сорта Вировский белый.

Эксплантаты гипокотили в первых опытах помещали горизонтально (а не вертикально, как в последующих опытах) на агаровую среду. В таких условиях участки гипокотили, взятые из верхней его части, увеличивались в длину на 5—6 мм, каллус и корни возникали редко. Можно подчеркнуть, что эксплантаты гипокотили дали значительно меньше новообразований, чем эксплантаты семядолей, при этом различия между сортами почти не обнаружены. Для сорта Сакса характерна тенденция пропорционального увеличения длины и ширины эксплантата гипокотили. У сорта Вировский белый эти показатели связаны меньше. Интересно отметить, что участки нижней части подсемядольного колена менее активны в отношении новообразований, чем в его верхней части. Размеры (длина и ширина) эксплантатов нижней части увеличились относительно меньше, чем эксплантатов верхней части гипокотили (см. табл. 1).

Итак, в первой серии опытов наметились пути проведения оценок восстановительных процессов и выявлены тенденции различий между сортами. При этом наблюдали более активную реакцию на ранение и изоляцию у эксплантатов семядолей, чем подсемядольного колена, поэтому в дальнейшем работа велась в основном с семядолями проростков.

В опытах, выполненных в 1971 г. на семядолях проростков, особенности сортов в характере регенерации повторялись. При проведении этих опытов семядоли изолировали двумя способами: или пол-

все же значительное сходство между сортами по многим показателям. Различие же между сортами обнаруживали при тщательном анализе многочисленных признаков-показателей. Мы считаем, что сравнительно однотипная реакция двух изучаемых сортов-популяций на ранение не случайное явление; вероятно, другие сорта-популяции — их гетерозиготные растения — дадут сходную реакцию на ранение. На эту мысль наводят нас данные, полученные при изучении в культуре инбредных линий редиса. Эти исследования продолжаются, но уже можно ска-

Таблица 3

Общая характеристика регенерационной способности сортов по пяти изученным признакам (размер семядоли, величина каллуса, длина и толщина черешка, тип корней) (1971 г.)

Варианты экспланти- рования	Сорт	n	Средние по пяти признакам (в баллах)		
			$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	t_{diff}	
С череш- ком	Сакса	66	$5,9 \pm 0,09$	8,8	2,3
	Вировский белый	98	$7,1 \pm 0,08$	—	—
Без че- решка	Сакса	55	$5,6 \pm 0,09$	—	—
	Вировский белый	46	$7,5 \pm 0,14$	2,9	11,9

зать, что инбредные линии редиса показали большое разнообразие по типу реакции и на ранение, по характеру регенерационных процессов у экплантатов. В настоящее время продолжается работа по оценке инбредных линий по вышеизложенному методу, поскольку необходимо выяснить степень повторяемости результатов, разработать методы качественных характеристик реакции у генетически различных форм.

Выводы

1. Для культивирования изолированных органов и тканей проростков редиса с целью изучения их регенерационной способности разработан способ стерилизации семян, подготовки растения-донора и деления проростка на экплантаты, а также метод культивирования регенератов.

2. Наиболее регенерационноспособными из всех изучаемых частей проростка редиса оказались листовые пластинки семядолей, которые в течение культивирования увеличивались в размерах, восстанавливали удаленный черешок, а на месте ранения формировали каллус или корешки.

3. В опытах установлены различия между регенератами сортов Вировский белый и Сакса по степени увеличения при культивировании размера регенератов листовых пластинок, намечаются различия по размеру регенерировавшего черешка семядоли и размеру каллуса на раневой поверхности.

Summary

For the study of regeneration ability of different forms of a genus *Raphanus sativus* var. *radicota* Pers. a method of tissue- and organ-culture of the seedling has been developed; the method of seed-sterilization, preparation of donor-plants and the divisions of seedlings for explantats and also the method of culture of regenerants.

Out of all the studied parts of the seedlings, the laminar part of the cotyledons appears to possess more ability for regeneration, which during the period of culture increased in size, restored its removed petiole and at the place of the wounds formed the callus or root.

In the experiments a clear difference between the regenerants of the varieties "Virovsky belley" and "Sachs" in the degree of increase of size of the regenerants of the leaf-blades has been established. Differences in the size of regenerated petioles of the cotyledons and the callus on the wounded surfaces have also been noted.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964.
- Кренке Н. П. Трансплантация растений. М., 1950.
- Полякова Т. Ф., Нарбут С. И., Кожина Т. Н. Изучение мейоза у инбредных линий редиса и их реципрокных гибридов. — «Генетика», 1967, № 4, с. 157—160.
- Токин Б. П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л., 1959.
- Нарбут С. И. Генетическая коллекция инбредных линий редиса. — «Генетика», 1966, № 5, с. 89—100.
- Фадеева Т. С. О связи процессов регенерации с общим ростом привитого растения. — Бот. журн., 1958, т. XIII, № 6, с. 788—798.
- Фадеева Т. С. Проблемы сравнительной генетики растений. II. Генетика признаков у земляники. — «Генетика», 1966, № 7, с. 100—117.
- Küster E. Pathologische Pflanzen Anatomie. 3. Aufl. Jena, 1925.
- Murakami Y. Genetic control of Gibberellin production in *Oryza sativa*. — Proc., 1968, 12, I.C.C., Tokyo, 131 p.
- Müntzing A., Akdik S. Cytological disturbances in the first inbred generations of rye. — Hereditas, 1948, No 34, p. 485—509.
- Pelton I. S. Genetic and morphogenetic studies of Angiosperm singlegene dwarfs. — Bot. revs., 1964, vol. 30, No 3, p. 479—511.
- Rees H. Genotypic control of chromosome behaviour in rye-1. Inbred lines. — Hereditas, 1955, No 9, p. 93—105.
- Riley R. A., Law C. N. Genetic variation in chromosome pairing. — Advs. genet., 1965, vol. 13, p. 57—107.
- Simon S. Über die Beziehungen zwischen Stoffstauung und Neubildungsvorgängen in isolierten Blättern. Z. Bot., 1920, Nr. 12.
- Steward F. C. Organization and interaction some problems of seeds their growth and nutrition. — In: Purdue Symposium on Growth. Basis Books, 1961, No 7, p. 453—490.
- Vöchting H. Über Transplantation am Pflanzenkörper. Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie. Tübingen, 1892.
- Vöchting H. Über Regeneration und Polarität bei höheren Pflanzen. — Bot. Ztg. Bd., 1906, Nr 64, S. 101—147.

РОЛЬ МУТАЦИОННОГО МЕТОДА В РАЗВИТИИ ПРИКЛАДНОЙ ГЕНЕТИКИ (на примерах из истории селекции микроорганизмов)

К. В. Квитко

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

«Итак, наследственные изменения у микроорганизмов, получаемые экспериментально, могут быть весьма разнообразны и очень существенны для жизни. Чаще (как и у высших организмов при мутациях) — это утрата тех или иных свойств, реже, но несомненно, бывает — это приобретение новых свойств, более сложных, более совершенных» (Г. А. Надсон, 1935. — Цит. по: Надсон, 1967, 243).

Подобно электронике, развивающейся на наших глазах, микробиологическая промышленность — детище науки, результат непосредственного вмешательства «чистой» теории в производственную деятельность общества. У человечества нет запаса эмпирических знаний в этих областях, позволяющего работать «наощупь», используя еще не вполне понятые явления, как это было, например, в пищевой промышлен-